

Aus dem Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin

Direktor: Professor Dr. med. Hans Herken

WIRKUNGEN EINER KOMBINATION VON CYCLOPHOSPHAMID
MIT ACTINOMYCIN D AUF RATTEN-EMBRYONEN

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an den

Medizinischen Fachbereichen der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Werner Kloppenburg

aus Hamm/Westf.

1972

Aus dem Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin

Direktor: Professor Dr. med. Hans Herken

**WIRKUNGEN EINER KOMBINATION VON CYCLOPHOSPHAMID
MIT ACTINOMYCIN D AUF RATTEN-EMBRYONEN**

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an den

Medizinischen Fachbereichen der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Werner Kloppenburg

aus Hamm/Westf.

Referent: Professor Dr.med. Diether Neubert

Korreferent: Professor Dr.med. Hans-Joachim Merker



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fach-
bereiche der Freien Universität Berlin.

Promoviert am 29. August 1972

I N H A L T

- A. Einleitung
- B. Beschreibung der verwendeten Pharmaka
 - 1. Cyclophosphamid
 - 2. Actinomycin D
- C. Methodik
 - 1. Tierstämme
 - 2. Paarung
 - 3. Applikationsart
 - 4. Behandlung der Kontrolltiere
 - 5. Präparation und Aufhellung
 - 6. Auswertung
 - 7. Wahl des Applikationstages
- D. Ergebnisse
 - I. Vergleich der Zahlen der Keimanlagen, der Resorptionen und der Durchschnittsgewichte
 - II. Vergleich der Skelettveränderungen bei behandelten und unbehandelten Gruppen
 - 1. Definition der Skelettveränderungen
 - 2. Bewertung der Veränderungen in den einzelnen Körperregionen
 - 3. Vergleich der Veränderungen an den beiden Kontroll-Gruppen
 - 4. Cyclophosphamid am Tag 11
 - 5. Cyclophosphamid am Tag 12
 - 6. Actinomycin D am Tag 12
 - 7. Actinomycin D + Cyclophosphamid am Tag 12
 - 8. Signifikante Unterschiede einiger Skelettveränderungen bei einzeln und kombiniert behandelten Gruppen
- E. Diskussion
- F. Zusammenfassung
- G. Durchführung des χ^2 -Testes
- Literaturverzeichnis
- Lebenslauf
- Anhang



Digitized by the Internet Archive
in 2026

A. Einleitung

=====

Seit der Contergan-Affäre ist die Öffentlichkeit auf besondere Gefahren aufmerksam geworden, die mit der Anwendung von Medikamenten verbunden sein können. Bei ständig steigendem Verbrauch von Arzneimitteln wird es immer dringender, über solche Nebenwirkungen mehr zu wissen. Darüberhinaus muß auch berücksichtigt werden, daß Schwangere gleichzeitig mehrere Pharmaka einnehmen. Es ist deshalb notwendig, die möglichen embryotoxischen und teratogenen Wirkungen von Medikamentenkombinationen herauszufinden. Allerdings ergibt sich eine wesentliche Schwierigkeit daraus, daß im klassischen Tierversuch gewonnene Ergebnisse nicht ohne weiteres auf den Menschen übertragen werden können. Immerhin gestattet der Test an verschiedenen Tierspezies in der Regel eine Vorauswahl potentiell schädigender Agenzien.

In der vorliegenden Arbeit werden besonders die Wirkungen auf das Skelett von Rattenembryonen nach kombinierter Applikation von Cyclophosphamid und Actinomycin untersucht. Folgende "embryotoxische" Wirkungen wurden in dieser Arbeit ausgewertet:

1. Retardierungen (Gewicht der Feten am Tag 21);
2. Embryo-Mortalität (Zahl der Resorptionen);
3. Abweichungen in der Entwicklung und der Verknöcherung des Skelettsystems.

Nach Anwendung einer Medikamentenkombination sind vier Resultate möglich:

1. Addition: Die prozentuale Häufigkeit der Veränderungen nach Anwendung einer Kombination entspricht etwa der Summe der Mißbildungen nach Anwendung der einzelnen Pharmaka der Kombination.
2. Potenzierung: Die Häufigkeit der Veränderungen nach Applikation einer Kombination beträgt mehr als die Summe der prozentualen Veränderungen nach Applikation der einzelnen Pharmaka der Kombination.

3. "Nichts"-Effekt: Die Häufigkeit der Veränderungen nach Applikation einer Kombination übersteigt nicht die Häufigkeit der Veränderungen nach Applikation des Präparates der Kombination mit der stärkeren Wirkung.
4. Antagonismus: Die Häufigkeit der Veränderungen nach Applikation einer Kombination ist geringer als die Häufigkeit der Veränderungen nach Applikation des Präparates der Kombination mit der geringeren Wirkung.

Diese Arbeit ist Teil einer größeren Untersuchungsreihe, die zusammen mit Waltraude Kochs durchgeführt wurde (Siehe Dissertation Kochs). Die Auswertung der Kontroll-Gruppen und der Tiere, die nur mit Cyclophosphamid behandelt wurden, ist Bestandteil beider Dissertationen.

B. Beschreibung der verwendeten Pharmaka

=====

1. Cyclophosphamid

Cyclophosphamid gehört zur Gruppe der Cytostatika. Dies ist ein pharmakologisch - therapeutisch orientierter Begriff für eine chemisch heterogene Stoffgruppe. Cytostatika hemmen das Wachstum teilungsaktiver Gewebe, wie z.B. Neoplasmen, blutbildender und embryonaler Gewebe. Ebenso kann die Immunlage des Organismus durch Hemmung der Antikörperbildung beeinträchtigt werden. Über die Wirkungsweise des Cyclophosphamids ist folgendes bekannt: Es muß im Körper in eine wirksame Substanz umgewandelt werden, um alkylierend aktiv sein zu können. Dies geschieht bevorzugt in der Leber durch oxydative Spaltung des Ringes. Obgleich hierbei N- oder O-Hydroxylierungen möglich sind, scheint eine Spaltung der P-N-Bindung wahrscheinlicher (BROCK u. HOHORST, 1967). Cyclophosphamid kann unter bestimmten Bedingungen die DNA-Synthese hemmen (PALME et al., 1963). Damit ist eine Störung der genetischen Informationsübertragung möglich. Andererseits kann offenbar eine Hemmung der Zellvermehrung bereits nach Einwirkung von Dosen auftreten, die noch nicht zu einer Hemmung der DNA-Synthese-

Vorgänge führen (L ISS et alt. 1969).

Bei Verwendung von Cyclophosphamid in entsprechender Dosierung besteht eine große Wahrscheinlichkeit, bei Rattenembryonen in einem bestimmten Stadium der Entwicklung Mißbildungen zu erzeugen, und zwar bereits bei Dosen, die eine Zehnerpotenz unter der für erwachsene Tiere letalen Dosis liegen.

Untersuchungen über die embryotoxische und teratogene Wirkung von Cyclophosphamid wurden von folgenden Autoren durchgeführt: WILSON (1964), KREYBIG (1964, 1965, 1968), ENGELS et alt. (1968), NEUBERT (1968), GIBSON und BECKER (1968 und 1969), BECKER (1969) und KÖHLER (1970).

2. Actinomycin D

Actinomycin D ist eins der Antibiotika, die spezifisch die RNA-Synthese hemmen (RNA-Polymerase-Reaktion). Diese Hemmung ist nur dann stark ausgeprägt, wenn die Matrizen-DNA reich an Deoxyguanosin ist. Eine Hemmung der RNA-Synthese entsteht dadurch, daß der chromophore Anteil des Actinomycins an das Deoxyguanosin der DNA-Matrize gebunden wird (GOLDBERG u. REICH, 1964. REICH, 1964). Untersuchungen über die biochemischen, embryotoxischen und teratogenen Wirkungen des Actinomycins wurden durchgeführt von: REICH et alt. (1961), WILSON (1964, 1966), TUCHMANN-DUPLESSIS et alt. (1966), ELIS u. DIPAOLO (1969) und KÖHLER (1970).

Um Anhaltspunkte über die Kombinationswirkung solcher Substanzen zu erhalten und um zu den verschiedenen Problemen einer Kombinationsbehandlung Stellung nehmen zu können, untersuchten wir die Wirkung von Cyclophosphamid allein und in Kombination mit Actinomycin D auf die Morphologie des Skeletts von Rattenembryonen.

C. Methodik

=====

1. Tierstämme

Aus technischen Gründen mußten wir während der Versuche den Tierstamm wechseln. Die Experimente wurden an 72 schwangeren

Ratten der beiden Stämme WISTAR SW 64 und SW 69 durchgeführt. Sie wogen ca. 200 Gramm. Etwa 590 Feten wurden ausgewertet. Als Futter erhielten die Tiere ALTROMIN-R; sie hatten dauernd Zugang zu Leitungswasser. Die Raumtemperatur betrug 25 Grad Celsius, die Luftfeuchtigkeit 50 bis 60 %.

2. Paarung

Der Zyklus von Ratten dauert drei bis vier Tage. Normalerweise erfolgt die Ovulation kurz nach Mitternacht. Die hormonale Regelung wird offenbar durch Licht gesteuert. Daraus folgt, daß der Ovulationstermin durch Belichtung willkürlich verschoben oder unterdrückt werden kann. Die Tiere wurden für unsere Versuche in einem abgewandelten Tag-Nacht-Rhythmus gehalten, um den Zeitpunkt der Ovulation in die Arbeitszeit fallen zu lassen. Sie hatten 16 Stunden Licht, und zwar von 12 h mittags bis 4 h morgens. Vor Versuchsbeginn wurden neugelieferte Tiere diesem Rhythmus mindestens 14 Tage lang angepaßt. Um 8 h morgens wurden sie für zwei Stunden zusammengesetzt, und zwar drei Weibchen zu einem Männchen in einen Macrolon-Käfig. Durch dieses Verfahren läßt sich der Zeitpunkt der Konzeption relativ genau ermitteln. Die Kenntnis des exakten Alters der Embryonen ist notwendig, um zu einem bestimmten Zeitpunkt Pharmaka applizieren und die Ergebnisse mit anderen Arbeiten vergleichen zu können. Vaginalabstriche wurden mikroskopisch auf Spermien untersucht. Die Schwangerschaftsrate betrug bei diesem Verfahren etwa 80 % der Spermien-positiven Tiere. Tag 0 bedeutet der Zeitraum vom Auffinden der Spermien gleich nach der Begattung bis 9 h des folgenden Tages.

3. Applikationsart

Als Cyclophosphamid wurde Endoxan^R der ASTA-Werke verwendet. Eine Ampulle enthielt 200 mg Endoxan plus 90 mg NaCl als Trockensubstanz. Die Substanz wurde in 200 ml physiologischer Kochsalzlösung gelöst. Die Endoxan-Lösung wurde am Tag 11 + 0

bzw. Tag 12 + 0 intraperitoneal appliziert. Als Actinomycin D wurde ein Präparat der Firma MERCK, SHARP & DOHME verwendet. Es wurde in physiologischer Kochsalz-Lösung gelöst und am Tag 12 + 0 subkutan appliziert.

4. Behandlung der Kontrolltiere

Den Kontrolltieren wurden die Lösungsmittel der oben genannten Pharmaka ohne Wirkstoffe zum gleichen Zeitpunkt appliziert.

5. Präparation und Aufhellung

Die Sectio fand am Tag 21 + 0 statt. Unmittelbar nach der Sectio wurde das Gewicht der Embryonen ohne Eihäute und Plazenten bis auf 10 mg genau bestimmt. An äußeren Auffälligkeiten fanden sich - jedoch nur vereinzelt - Ödeme, Anasarka und Meningozelen. Nach dem Wiegen wurden die Embryonen 7 bis 14 Tage in 10%-ige Formollösung gelegt. Darauf wurden Haut, Augen, subepitheliales Fett und die Eingeweide entfernt. Die präparierten Embryonen wurden eine Stunde lang mit Wasser gewaschen. Dann wurden sie zunächst 30 Minuten, und nach Wechseln anschließend nochmals 12 Stunden in Aceton gelegt. Die Aufhellung erfolgte in 10%-iger KOH, in der 6 mg/l Alizarin gelöst waren. Zur hinreichenden Aufhellung und Anfärbung des Skeletts wurden 6 bis 8 Tage benötigt. In dieser Zeit wurde die Lösung öfter erneuert und die Konzentration der KOH bis auf 1% gesenkt. Nach der Aufhellung wurden die Embryonen eine halbe Stunde lang in destilliertem Wasser ausgewaschen. Vor dem endgültigen Einbetten in Glycerin wurden die Tiere noch 12 Stunden in ein Gemisch aus Benzylalkohol, Athanol und Glycerin im Verhältnis 1 : 2 : 2 gelegt.

6. Auswertung

Ausgewertet wurden die Tiere unter einer Stereo-Lupe bei Vergrößerungen von 2 bis 40. Die Begutachtung fand in folgender Reihenfolge statt: Kopf, Hyoid, Sternum, Schultergürtel, obere

und untere Extremitäten, Beckengürtel, Wirbelsäule und Rippen.

7. Wahl des Applikationstages

Ausmaß, Art und Lokalisation eines embryotoxischen Effekts sind einmal abhängig vom Stadium der Organdetermination und -differenzierung, in dem das schädigende Pharmakon appliziert wurde. Determination und Differenzierung einzelner Organe oder von Organsystemen verlaufen nicht synchron, sodaß mit unterschiedlichen Schädigungen zu rechnen ist, je nach dem Zeitpunkt der Applikation während der fetalen Entwicklung. Zum anderen hängt die Schädigung der Frucht ab von der Art des verwendeten Pharmakons und seiner Dosierung. Am Tag 12 erfolgt die Umstellung von histotropher auf hämatotrophe Ernährung (Nabelanschluß); die Entwicklung der Primitivorgane ist am Tag 11 noch in vollem Gange.

Nach TUCHMANN-DUPLESSIS (1969) erzeugt Actinomycin D nur während der frühen Periode der Organogenese Mißbildungen am RATTEN-Fetus, und zwar zwischen Tag 7 und 9. Daß bei späterer Applikation von Actinomycin D, z.B. nach dem Nabelanschluß am Tag 12, keine Mißbildungen mehr erzeugt wurden, ist bisher damit erklärt worden, daß der Fetus von den relativ großen Molekülen des Actinomycin D diaplacentar nicht mehr erreicht wird (VON KREYBIG, 1968).

Wir applizierten die Pharmaka-Kombination am Tag 12 um herauszufinden, ob eine Mißbildung des Fetus möglich ist, die auf einen Angriffspunkt bzw. Schädigung der Plazenta oder des Uterus durch Actinomycin D zurückzuführen ist und ob mit Cyclophosphamid ein synergistischer oder antagonistischer Effekt auf den Fetus erreicht wird. Cyclophosphamid wirkt direkt auf den Fetus.

D. Ergebnisse

=====

- I. Vergleich der Anzahl der Keimanlagen, der Resorptionen, sowie der Durchschnittsgewichte (Tabelle 1)

Verwendet wurden Kontroll-Tiere aus zwei verschiedenen Stämmen, 10 vom Stamm WISTAR SW 64 mit 97 Keimanlagen, keine Resorptionen; und 12 vom Stamm SW 69 mit 110 Keimanlagen, ebenfalls keine Resorptionen. Die durchschnittliche Anzahl der Keimanlagen betrug 9,7 beim Stamm SW 64 und 9,17 beim Stamm SW 69. Der Unterschied ist nicht signifikant ($P > 0,01$ nach dem t-Test). Signifikanz bedeutet in dieser Arbeit: $P < 0,0027$. Beide Gruppen wurden daher bezüglich der durchschnittlichen Zahl der Keimanlagen als eine Gruppe zusammengefaßt (Durchschnitts-Zahl: 9,41). Die beiden Kontroll-Gruppen unterscheiden sich in Bezug auf die Durchschnittsgewichte ebenfalls nicht signifikant ($P < 0,80$). Darum können die beiden Gruppen aus verschiedenen Stämmen auch bezüglich der Durchschnittsgewichte als eine Gruppe betrachtet werden beim Vergleich mit behandelten Gruppen. Das Durchschnittsgewicht der Gesamt-Kontrolle (207 Embryonen) beträgt 2,94 Gramm.

Jeweils 6 Tiere des Stammes SW 64 wurden am Tag 11 + 0 mit 4 bzw. 6 mg Cyclophosphamid behandelt. Bei der mit 4 mg/kg behandelten Gruppe von 52 Keimanlagen gab es keine Resorptionen, während bei der mit 6 mg/kg behandelten Gruppe bei 49 Keimanlagen 9 Resorptionen (18,4%) gefunden wurden. Beide Gruppen weichen bezüglich des geringeren Durchschnittsgewichts signifikant von der Gesamt-Kontrolle ($P < 0,001$) ab.

5 Tiere des Stammes SW⁶⁹ wurden am Tag 12 + 0 mit 4 mg/kg Cyclophosphamid behandelt. Bei 48 Keimanlagen gab es 2 Resorptionen (4,2%). Das Durchschnittsgewicht gegenüber der Gesamtkontrolle war nicht signifikant verringert.

6 Tiere des Stammes SW 64 wurden am Tag 12 + 0 mit 5 mg/kg Cyclophosphamid behandelt. Bei 56 Keimanlagen betrug die Zahl der Resorptionen 2 (3,6%). Das Durchschnittsgewicht gegenüber der Gesamtkontrolle war nicht signifikant verringert.

Tabelle 1

Pharmaka		Zahl der schwangeren Tiere	Keimanlagen	Durchschnittliche Zahl der Keimanlagen pro Tier
Kontrolle 1, Stamm WISTAR SW 64		10	97	9,7
Kontrolle 2, Stamm WISTAR SW 69		12	110	9,17
Kontrolle gesamt		22	207	9,41
4 mg/kg	Cyclophosphamid i.p. Tag 11 Stamm WISTAR SW 64	6	52	8,67
6 mg/kg	Cyclophosphamid i.p. Tag 11 Stamm WISTAR SW 64	6	49	8,17
4 mg/kg	Cyclophosphamid i.p. Tag 12 Stamm WISTAR SW 69	5	48	9,60
5 mg/kg	Cyclophosphamid i.p. Tag 12 Stamm WISTAR SW 64	6	56	9,33
6 mg/kg	Cyclophosphamid i.p. Tag 12 Stamm WISTAR SW 69	9	77	8,55
100 µg/kg	Actinomycin D s.c., Tag 12 Stamm WISTAR SW 64	4	34	8,50
150 µg/kg	Actinomycin D s.c., Tag 12 Stamm WISTAR SW 64	6	57	9,50
100 µg/kg + 4 mg/kg	Actinomycin D s.c., Tag 12 Cyclophosphamid i.p. Tag 12 Stamm WISTAR SW 64	4	30	7,50
100 µg/kg + 6 mg/kg	Actinomycin D s.c., Tag 12 Cyclophosphamid i.p. Tag 12 Stamm WISTAR SW 64	4	35	8,75

Tabelle 1, Fortsetzung

Mittlere Abweichung 6	t-Verteilung gegen die Gesamtkontrolle; darunter die Wahrscheinlichkeit p	Zahl der Resorptionen, in Klammern Zahlen in %	Wurfzahl; alle lebend bei der Sectio	Durchschnittsgewicht in Gramm	Mittlere Abweichung 6	t-Verteilung gegen die Gesamtkontrolle; darunter die Wahrscheinlichkeit p
1,70	-	0	97	2,93	0,254	-
1,26	-	0	110	2,94	0,407	-
1,46	-	0	207	2,94	0,343	-
0,51	6,0 $P < 0,001$	0	52	2,71	0,227	5,9 $P < 0,001$
2,13	3,9 $P < 0,001$	9 (18,4%)	40	2,63	0,260	6,6 $P < 0,001$
0,54	1,5 $P > 0,10$	2 (4,2%)	46	2,75	0,352	3,3 $P > 0,01$
1,03	0,5 $P > 0,70$	2 (3,6%)	54	2,88	0,295	1,2 $P > 0,30$
2,18	3,2 $P \approx 0,01$	3 (3,9)	74	2,62	0,30	7,4 $P < 0,001$
1,29	3,73 $P < 0,001$	0	34	2,84	0,275	1,9 $P > 0,10$
2,16	0,30 $P > 0,80$	0	57	2,78	0,265	3,7 $P < 0,001$
3,87	2,67 $P > 0,01$	0	30	2,87	0,280	1,3 $P > 0,30$
3,68	1,05 $P > 0,30$	0	35	2,71	0,392	3,3 $P \sim 0,001$

9 Tiere des Stammes SW 69 wurden am Tag 12 + 0 mit 6 mg/kg Cyclophosphamid behandelt. Bei 77 Keimanlagen gab es 3 Resorptionen (3,9%). Das Durchschnittsgewicht war gegenüber der Gesamtkontrolle signifikant verringert ($P < 0,001$).

4 Tiere des Stammes SW 64 wurden am Tag 12 + 0 mit 100 μ g/kg Actinomycin D behandelt. Bei 34 Keimanlagen gab es keine Resorptionen. Das Durchschnittsgewicht gegenüber der Gesamtkontrolle war nicht signifikant verringert.

6 Tiere des Stammes SW 64 wurden am Tag 12 + 0 mit 150 μ g/kg Actinomycin D behandelt. Bei 57 Keimanlagen gab es keine Resorptionen. Das Durchschnittsgewicht war gegenüber der Gesamtkontrolle signifikant verringert ($P < 0,001$).

4 Tiere des Stammes SW 64 wurden am Tag 12 + 0 kombiniert mit 100 μ g/kg Actinomycin D und 4 mg/kg Cyclophosphamid behandelt. Bei 30 Keimanlagen gab es keine Resorptionen. Das Durchschnittsgewicht gegenüber der Gesamtkontrolle war nicht signifikant verringert.

4 Tiere des Stammes SW 64 wurden am Tag 12 + 0 kombiniert mit 100 μ g/kg Actinomycin D und 6 mg/kg Cyclophosphamid behandelt. Bei 35 Keimanlagen gab es keine Resorptionen. Das Durchschnittsgewicht war gegenüber der Gesamtkontrolle signifikant verringert ($P \sim 0,001$).

II. Vergleich der Skelettveränderungen bei behandelten und unbehandelten Gruppen (Tabelle 2).

1. Definition der Skelettveränderungen

Am Os parietale wurde als Veränderung registriert, wenn wenigstens eines der folgenden Kriterien vorlag: regelmäßig reduzierte mediale und/oder posteriore Verknöcherung; längliche, splitterförmige, von medial oder posterior in den Knochen hineinragende fehlende Verknöcherung; viertelkreis- bzw. bogenförmig begrenzte

Veränderungen der Verknöcherung von medial oder posterior her. Die Veränderungen traten ein- oder beiseitig auf. Völliges Fehlen der Parietalknochen wurde nicht beobachtet.

Eine Veränderung am Os interparietale galt, wenn es halbseitig nicht verknöchert, oder auf mindestens die halbe Größe verkleinert oder garnicht vorhanden war (sehr selten).

Eine Veränderung am Os supraorbitale lag vor, wenn es halbseitig fehlte, oder nur angelegt war oder ganz fehlte (selten). Andere Veränderungen wurden an den Schädelknochen nicht beobachtet.

An der Vertebra traten Veränderungen nur am Corpus vertebrae auf, sowohl knorpelartige Verknöcherungen als auch sagittale Spaltungen. Es war selten wurden sagittale Verwachsungen gespaltenen Wirbelkörper gefunden; sie wurden zur Pathik der gespaltenen gezählt. Eine Veränderung galt, wenn mindestens ein Corpus vertebrae knorpelartig ausgefüllt oder gespalten bzw. gespalten und mit einem anderen verwachsen war. Sowohl einzelne als auch mehrfach an einem Wirbel beobachtete Veränderungen kamen nur vor in einem Bereich von drei bis vier Wirbelkörpern kranial und kaudal von dem als thorako-lumbale "Wirbelsäulengrenze" gedachten Punkt zwischen dem letzten thorakalen und dem ersten lumbalen Wirbelkörper.

Eine Veränderung an den vorderen Extremitäten lag vor, wenn weniger als drei Metacarpalia an mindestens einer Extremität vorhanden waren. Veränderungen an Radius, Ulna und Humerus und an den hinteren Extremitäten wurden nicht beobachtet.

Eine Veränderung an den 12. Rippen bedeutet die mindestens einseitige Verkürzung dieser Rippe auf etwa die Hälfte der normalen Länge.

12. Rippen wurden registriert, wenn mindestens einseitig ein Rudiment zu sehen war. Andere und anderweitig lokalisierte Veränderungen traten an den Rippen nicht auf.

Unter Veränderung am Sternum wird verstanden, wenn mindestens ein Sternum-Kern vollständig fehlte. In keiner Gruppe fehlten jedoch gleichzeitig alle Kerne bei einem Embryo.

Beim Hyoid wurde nur vollständiges Fehlen der Verknöcherung registriert.

2. Bewertung der Veränderungen in den einzelnen Körperregionen.

Unter den in Tabelle 2 aufgeführten Skelettveränderungen sind die am Sternum und am Hyoid von untergeordneter Bedeutung. Der ziemlich hohe Prozentsatz der Veränderungen schon bei den Kontroll-Gruppen läßt einen Vergleich mit behandelten Gruppen als relativ unergiebig erscheinen.

Da nur an den 13. Rippen die bereits erwähnten Veränderungen auftraten - keine Verwachsungen oder Gabelungen - , können sie allenfalls als Retardierung verstanden werden, die keine schwerwiegenden funktionellen Folgen hat. Deshalb wird diese Skelettregion in den Zusammenfassungen nicht mit den Werten der Kontroll-Gruppe verglichen. Das gleiche gilt für die Rudimente der 14. Rippe; denn eine abnehmende Rate bei behandelten Tieren im Vergleich zur Kontroll-Gruppe weist allenfalls auf einen schwachen Retardierungseffekt hin.

Von funktioneller Bedeutung für die normale Entwicklung bzw. die Lebensfähigkeit der Keime sind jedoch die Extremitäten, die Vertebra, und besonders die Schädelknochen, weil ihre verzögerte oder mangelhafte Ausbildung - d.h. abnorme Vergrößerung der Fontanellen - die Bedingung abgeben für schwere organische Mißbildungen. Dementsprechend werden die Schädel-, Vertebral- und Extremitätenknochen nachfolgend bei den Zusammenfassungen als "relevante Skelettregionen" bezeichnet.

3. Vergleich der Veränderungen an den beiden Kontroll-Gruppen

Die Häufigkeiten der Veränderungen werden als "Rate" abgekürzt, die Stämme mit SW 64 und 69.

Die Resorptionsrate ist gleich (beide 0 %).

In Bezug auf das Os parietale rechtsseitig sind die Raten bei den beiden Ratten-Stämmen - beide Wistar! - unterschiedlich: 1,5% bei SW 64 und 0,9 % bei SW 69 (in beiden Gruppen numerisch nur einmal auftretend). Bezogen auf die bilateralen Raten ist die Häufigkeit bei SW 69 mehr als eineinhalb mal so hoch (16,4%) wie bei SW 64 (10,1 %). Linksseitig besteht kein Unterschied (beide 0 %). Alle diese Unterschiede sind jedoch bei der geringen Zahl der untersuchten Feten nicht signifikant.

Die Rate ist beim Os interparietale bei SW 64 erhöht (1,5%) gegenüber 0 % bei SW 69.

Beim Os supraoccipitale liegt die Rate der Abnormitäten fast zehnmal so hoch bei SW 69 (14,5%) wie bei SW 64 (1,5%).

Die Rate ist bei der Vertebra bezüglich der hantelförmigen Veränderungen bei SW 64 achtmal so hoch (7,2%) wie bei SW 69 (0,9%); in Bezug auf die Spaltbildungen besteht nur eine geringe Erhöhung bei SW 64 (1,5%) gegenüber SW 69 (0,9%).

Bei den vorderen Extremitäten ist die Rate etwa dreimal so hoch bei SW 69 (4,6%) wie bei SW 64 (1,5%).

In Bezug auf die 13. Rippen bestehen keine Unterschiede (beide Gruppen 0 %).

Die Häufigkeit von Rudimenten der 14. Rippen ist bei SW 69 etwas mehr als doppelt so hoch (16,4%) wie bei SW 64 (7,2%).

Die Sternum-Rate ist etwa dreimal so hoch bei SW 69 (50,8%) wie bei SW 64 (17,4%).

Die Rate ist am Hyoid etwa eineinhalbmal so hoch bei SW 69 (13,7%) wie bei SW 64 (8,7%).

Zusammenfassung: Die Raten der Veränderungen sind - im Hinblick auf die relevanten Skelettregionen - beim Stamm SW 69 teilweise höher als beim Stamm SW 64, nämlich beim Os parietale bilateral, Os supraoccipitale und den vorderen Extremitäten; teilweise aber auch erniedrigt (beim Os parietale dextrolateral, Os interparietale und bei den Vertebrae). Die Raten des Os parietale sinistrolateral und der Resorptionen unterscheiden sich nicht.

4. Cyclophosphamid am Tag 11

Für die Fragestellung dieser Arbeit - den Vergleich verschiedener Gruppen, die am gleichen Tag der Gravidität mit einem bzw. zwei Pharmaka behandelt wurden - sind die Veränderungen an Embryonen, deren Muttertiere am Tag 11 mit Cyclophosphamid behandelt wurden, nur ein Nebenfund (die andern Tiergruppen wurden am Tag 12 behandelt). Dennoch sind die beiden am Tag 11 mit 4 bzw. 6 mg/kg Cyclophosphamid behandelten Gruppen des Stammes SW 64 insofern von Interesse, als sie Hinweise auf eine unterschiedliche Empfindlichkeit des embryonalen Organismus auf embryotoxische oder teratogene Agenzien an zwei aufeinanderfolgenden Tagen der Entwicklung liefern können. Bezüglich der Ergebnisse der mit 4 mg/kg Cyclophosphamid behandelten Gruppe ist Vorsicht bei der Deutung angebracht, weil nur 25 von 52 Embryonen mikroskopisch ausgewertet wurden, die Zahl also im Vergleich mit anderen Gruppen sehr klein ist. Darum werden beide am Tag 11 behandelten Gruppen nicht exakt sondern nur der Tendenz nach miteinander verglichen, die mit 6 mg/kg behandelten Gruppe jedoch genau mit der Kontroll-Gruppe.

a) 4 mg/kg Cyclophosphamid

Die Raten verhalten sich bei der am Tag 11+0 mit 4 mg/kg Cyclophosphamid behandelten Gruppe des Stammes SW 64 im Vergleich zur Kontroll-Gruppe des gleichen Stammes wie folgt (erste Zahl: behandelte Gruppe; zweite Zahl: Kontroll-Gruppe):

Kein Unterschied bei den Resorptionen (beide 0%). Erniedrigter Wert beim Os parietale dextrolateral (0% gegen 1,5%), kein Unterschied

Tabelle 2

Skelettveränderungen	Kontrolle 1 Stamm WISTAR SW 64	Kontrolle 2 Stamm WISTAR SW 69	4 mg/kg Cyclophosphamid i.p., Tag 11 Stamm WISTAR SW 64	6 mg/kg Cyclophosphamid i.p., Tag 11 Stamm WISTAR SW 64
Zahl der Embryonen,	97	110	52	40
davon ausgewertet	69	110	25	40
Resorptionen (bezogen auf die Gesamtzahl)	0	0	0	9 (19,4%)
nur rechts	1 (1,5%)	1 (0,9%)	0	0
Os parietale nur links	0	0	0	0
nur rechts und links	7 (10,1%)	18 (16,4%)	0	5 (12,5%)
Os interparietale	1 (1,5%)	0	1 (4,0%)	4 (10,0%)
Os supraoccipitale	1 (1,5%)	16 (14,5)	1 (4,0%)	1 (2,5%)
Vertebrae hantelförmig	5 (7,2%)	1 (0,9%)	14 (56,0%)	30 (75,0%)
gespalten	1 (1,5%)	1 (0,9%)	8 (32,0%)	32 (80,0%)
Vordere Extremitäten, weniger als 3 Metacarpal.	1 (1,5%)	5 (4,6%)	0	0
13. Rippen	0	0	0	20 (50,0%)
14. (Rudimente)	5 (7,2%)	18 (16,4%)	0	0
Sternum-Kerne	12 (17,4%)	56 (50,8%)	4 (16,0%)	23 (57,5%)
Hyoid	6 (8,7%)	15 (13,7%)	2 (8,0%)	1 (2,5%)

Tabelle 2, Fortsetzung

4 mg/kg Cyclophosphamid i.p., Tag 12 Stamm WISTAR SW 69	5 mg/kg Cyclophosphamid i.p., Tag 12 Stamm WISTAR SW 64	6 mg/kg Cyclophosphamid i.p., Tag 12 Stamm WISTAR SW 69	100 μ g/kg Actinomycin D. s.c., Tag 12 Stamm WISTAR SW 64	150 μ g/kg Actinomycin D. s.c., Tag 12 Stamm WISTAR SW 64	100 μ g/kg Actinomycin D. s.c., Tag 12 + 4 mg/kg Cyclophosphamid d.i.p., Tag 12 Stamm WISTAR SW 64	100 μ g/kg Actinomycin D. s.c., Tag 12 + 6 mg/kg Cyclophosphamid, i.p., Tag 12 Stamm WISTAR SW 64
46	54	74	34	57	30	35
46	54	74	34	57	30	35
2 (4,2%)	2 (3,6%)	3 (3,9%)	0	0	0	0
1 (2,2%)	0	0	1 (2,9%)	0	0	0
0	0	0	0	1 (1,8%)	1 (3,3%)	0
0	1 (1,9%)	7 (9,5%)	5 (14,7%)	2 (3,6%)	0	0
1 (2,2%)	0	12 (16,2%)	0	1 (1,8%)	0	1 (2,9%)
2 (4,3%)	0	23 (31,3%)	0	0	0	1 (2,9%)
1 (2,2%)	12 (22,2%)	11 (14,9%)	0	19 (33,4%)	6 (20,0%)	11 (31,4%)
0	4 (7,4%)	4 (5,4%)	0	1 (1,8%)	0	3 (8,6%)
0	0	0	0	0	0	2 (5,7%)
1 (2,2%)	0	0	0	0	0	1 (2,9%)
1 (2,2%)	0	5 (6,8%)	0	1 (1,8%)	0	0
33 (71,8%)	2 (14,3%)	68 (91,9%)	3 (8,8%)	6 (10,5%)	7 (23,3%)	10 (28,6%)
2 (17,4%)	5 (9,3%)	5 (6,8%)	0	0	1 (3,3%)	0

sinistrolateral (beide 0%), stark erniedrigter Wert bilateral (0% gegen 10,1%). Erhöhte Werte beim Os interparietale und supraoccipitale (beide 4% gegen 0%). Deutlich erhöhte Raten bei der Vertebra; hantelförmig 56,0% gegen 7,2%, gespalten 32,0% gegen 1,5%. Erniedrigte Rate bei den vorderen Extremitäten (0% gegen 1,5%). Kein Unterschied bei den 13. Rippen (beide 0%), erniedrigte Rate bei den 14. Rippen (0% gegen 7,2%). Etwas erniedrigt sind die Raten beim Sternum (16,0% gegen 17,4%) und Hyoid (8,0% gegen 8,7%).

Zusammenfassung: Eine Tendenz zur deutlichen Steigerung der Raten bei der mit 4 mg/kg Cyclophosphamid behandelten Gruppe ist nur bezüglich der Vertebra vorhanden.

b) 6mg/kg Cyclophosphamid

Vergleich der Raten der am Tag 11+0 mit 6 mg/kg Cyclophosphamid behandelten Gruppe des Stammes SW 64 mit der Kontroll-Gruppe des gleichen Stammes (erste Zahl: behandelte Gruppe, zweite Zahl: Kontroll-Gruppe): Starke Erhöhung der Resorptionen (18,4% gegen 0%). Die Raten sind beim Os parietale dextrolateral erniedrigt (0% gegen 1,5%), sinistrolateral ohne Unterschied (beide 0%) und bilateral erhöht (12,5% gegen 10,1%). Beim Os interparietale ist die Rate beträchtlich erhöht (10,0% gegen 1,5%), beim Os supraoccipitale kaum erhöht (2,5% gegen 1,5%). Die Raten sind sehr stark erhöht bei den Vertebrae, hantelförmig 75,0% gegen 7,2%, gespalten 80,0% gegen 1,5%. Bei den vorderen Extremitäten ist der Wert eher erniedrigt (0% gegen 1,5%), bei den 13. Rippen stark erhöht (50,0% gegen 0%) und bei den 14. Rippen erniedrigt (0% gegen 7,2%). Die Rate der Sternum-Abweichungen ist erhöht (57,5% gegen 17,4%), die Rate beim Hyoid erniedrigt (2,5% gegen 8,7%).

Zusammenfassung: Sofern bei beiden Gruppen überhaupt Veränderungen vorlagen, ist im Hinblick auf die relevanten Skelettregionen bei der behandelten Gruppe eine fast generelle, z.T. starke Steigerung der Raten festzustellen (Ausnahme: Os parietale dextrolateral

und vordere Extremitäten). Die Raten bei der mit 6 mg/kg behandelten Gruppe sind fast immer höher als bei der mit 4 mg/kg behandelten Gruppe (Ausnahme: Os supraoccipitale).

5. Cyclophosphamid am Tag 12

a) 4 mg/kg Cyclophosphamid

Vergleich der am Tag 12+0 mit 4 mg/kg Cyclophosphamid behandelten Gruppe des Stammes SW 69 mit der Kontroll-Gruppe des gleichen Stammes (erste Zahl: behandelte Gruppe, zweite Zahl: Kontroll-Gruppe):

Etwas erhöhte Rate bei den Resorptionen (4,2% gegen 0%). Die Rate ist ebenfalls kaum erhöht beim Os parietale dextrolateral (2,2% gegen 0%), ohne Unterschied sinistrolateral und stark erniedrigt bilateral (0% gegen 16,4%). Kaum erhöhte Rate beim Os interparietale (2,2% gegen 0%), erniedrigte beim Os supraoccipitale (4,3% gegen 14,5%). Bei der Vertebra ist die Rate ebenfalls kaum erhöht (hantelförmig: 2,2% gegen 0,9%), teilweise unverändert (gespalten: 0% gegen 0,9%). Eine erniedrigte Rate wurde bei den vorderen Extremitäten (0% gegen 4,6%), eine kaum erhöhte Rate bei den 13. Rippen (2,2% gegen 0%), eine erniedrigte bei den 14. Rippen (2,2% gegen 16,4%) beobachtet. Die Rate der Sternum-Veränderungen ist erhöht (71,8% gegen 50,8%), die Hyoid-Rate unverändert (17,4% gegen 13,7%).

Zusammenfassung: Die Raten bei der behandelten Gruppe im Vergleich zur Kontroll-Gruppe sind kaum erhöht (Resorptionen, Os parietale dextrolateral, Os interparietale und Vertebra hantelförmig), teilweise sogar erniedrigt (Os parietale bilateral, Os supraoccipitale, Vertebra gespalten und vordere Extremitäten).

b) 5 mg/kg Cyclophosphamid

Vergleich der am Tag 12+0 mit 5 mg/kg Cyclophosphamid behandelten Gruppe des Stammes SW 64 mit der Kontroll-Gruppe des gleichen Stammes (erste Zahl: behandelte Gruppe, zweite Zahl: Kontroll-Gruppe):

Wenig erhöhte Resorptionsrate (3,6% gegen 0%). Die Rate der Veränderungen ist beim Os parietale dextrolateral unverändert (0% gegen 1,5%), sinistrolateral ebenfalls ohne Unterschied (beide 0%) und bilateral deutlich erniedrigt (1,9% gegen 10,1%). Beim Os interparietale und supraoccipitale sind die Raten unverändert (beide 0% gegen 1,5%), bei der Vertebra jedoch deutlich erhöht (hantelförmig 22,2% gegen 7,2%, gespalten 7,4% gegen 1,5%). Unveränderte Rate bei den vorderen Extremitäten (0% gegen 1,5%), keine Unterschiede bei den 13. Rippen (beide 0%), erniedrigte Rate bei den 14. Rippen (0% gegen 7,2%). Ebenfalls unverändert ist die Sternum-Rate (14,8% gegen 17,4%) ebenso wie die Hyoid-Rate (9,3% gegen 8,7%).

Zusammenfassung: Bezogen auf die Kontroll-Gruppe steigen die Raten bei der behandelten Gruppe teilweise an (Resorptionen, Vertebra um das drei- bis fünffache), während sie im übrigen leicht (Os parietale dextrolateral, Os interparietale und supra-occipitale und vordere Extremitäten) und in einem Fall stark erniedrigt sind (Os parietale bilateral auf ein Fünftel).

c) 6 mg/kg Cyclophosphamid

Vergleich der am Tag 12+0 mit 6 mg/kg Cyclophosphamid behandelten Gruppe des Stammes SW 69 mit der Kontroll-Gruppe des gleichen Stammes (erste Zahl: behandelte Gruppe, zweite Zahl: Kontroll-Gruppe):

Die Resorptionsrate ist erhöht (3,4% gegen 0%). Unveränderte Rate der Veränderungen beim Os parietale dextrolateral (0% gegen 0,9%), etwas erniedrigt bilateral (9,5% gegen 16,4%); kein Unterschied sinistrolateral (beide 0%). Eine stark erhöhte Rate findet sich beim Os interparietale (16,2% gegen 0%), und supraoccipitale (31,3% gegen 14,5%) und den Vertebrae (hantelförmig 14,9% gegen 0,9%; gespalten 5,4% gegen 0,9%). Leicht erniedrigte Raten werden gefunden bei den vorderen Extremitäten (0% gegen 4,6%) und den 14. Rippen (6,8% gegen 16,4%); kein Unterschied bei den 13. Rippen (beide 0%). Die Sternum-rate ist deutlich erhöht (91,9% gegen 50,8%), die Hyoidrate erniedrigt (6,0% gegen 13,7%).

Zusammenfassung: Die Raten sind bei dieser behandelten Gruppe verglichen mit der Kontrolle teilweise deutlich erhöht (Resorptionen), z.T. sogar erheblich (Os interparietale, supraoccipitale und Vertebra), teilweise erniedrigt (Os parietale dextrolateral), in zwei Fällen deutlich (Os parietale bilateral und vordere Extremitäten). Vergleicht man die beiden mit 4 bzw. 6 mg/kg Cyclophosphamid behandelten Gruppen des gleichen Stammes in Bezug auf die relevanten Skelettregionen, so ist mit steigender Dosis fast generell ein starker Anstieg der Raten festzustellen (Ausnahmen: verringerte Raten beim Os parietale dextrolateral und bei den Resorptionen, kein Unterschied beim Os parietale sinistrolateral).

6. Actinomycin D am Tag 12

a) 100 µg/kg Actinomycin D

Vergleich der am Tag 12+0 mit 100 µg/kg Actinomycin D behandelten Gruppe des Stammes SW 64 mit der Kontroll-Gruppe des gleichen Stammes (erste Zahl: behandelte Gruppe, zweite Zahl: Kontroll-Gruppe):

Kein Unterschied der Resorptionsraten (beide 0%). Kaum erhöhte Rate beim Os parietale dextrolateral (2,9% gegen 1,5%) und bilateral (14,7 % gegen 10,1%); kein Unterschied sinistrolateral (beide 0%). Alle übrigen Raten sind leicht bis stark erniedrigt (Ausnahme: 13. Rippen, ohne Unterschied, beide 0%). Os interparietale und supraoccipitale beide 0% gegen 1,5%; Vertebra hantelförmig 0% gegen 7,2%, gespalten 0% gegen 1,5%; vordere Extremitäten 0% gegen 1,5%; 14. Rippen 0% gegen 7,2%; Sternum 8,8% gegen 17,4% und Hyoid 0% gegen 8,7%.

Zusammenfassung: Bei der behandelten Gruppe ist, verglichen mit der Kontroll-Gruppe, die Rate der Veränderungen nur in zwei Fällen angegeben erhöht (Os parietale dextrolateral und bilateral), während sie im übrigen leicht, bei den Vertebrae hantelförmig, sogar erniedrigt ist.

b) 150 μ g/kg Actinomycin D

Vergleich der am Tag 12+0 mit 150 μ g/kg Actinomycin D behandelten Gruppe des Stammes SW 64 mit der Kontroll-Gruppe des gleichen Stammes (erste Zahl: behandelte Gruppe, zweite Zahl: Kontroll-Gruppe):

Kein Unterschied der Resorptionsraten (beide 0%). Die Rate ist beim Os parietale dextrolateral unverändert (0% gegen 1,5%), sinistrolateral ebenfalls (1,8% gegen 0%) und bilateral erniedrigt (3,6% gegen 10,1%). Unverändert ist die Rate beim Os interparietale (1,8% gegen 1,5%), und beim Os supraoccipitale (0% gegen 1,5%). Bei den Vertebrae ist die Rate teils stark (hantelförmig: 33,4% gegen 7,2%), erhöht, teils unverändert (gespalten: 1,8% gegen 1,5%). Kein Unterschied besteht bei den 13. Rippen (beide 0%) und bei den vorderen Extremitäten (0% gegen 1,5%), sowie dem Sternum (10,5% gegen 17,4%). Eine deutliche Verminderung der Rate der Abnormitäten wird bei den 14. Rippen (1,8% gegen 7,2%) und dem Hyoid gefunden (0% gegen 8,7%).

Zusammenfassung: Bei der behandelten Gruppe ist im Vergleich zur Kontroll-Gruppe die Rate der Veränderungen in einem Fall deutlich erhöht (Vertebra hantelförmig). Beim Os interparietale und der Vertebra (gespalten) liegt keine Abweichung gegenüber den Kontrollen vor. Im übrigen sind die Raten eher erniedrigt, beim Os parietale bilateral sogar deutlich.

7. 100 μ g/kg Actinomycin D + 4 mg/kg Cyclophosphamid

Vergleich der am Tag 12 + 0 kombiniert mit 100 μ g/kg Actinomycin D plus 4 mg/kg Cyclophosphamid behandelten Gruppe des Stammes SW 64 mit der Gruppe des gleichen Stammes, die am Tag 12+0 mit 100 μ g/kg Actinomycin D behandelt wurde, und mit der Gruppe des Stammes SW 69, die am Tag 12+0 mit 4 mg/kg Cyclophosphamid behandelt wurde, und zwar unter dem Gesichtspunkt, ob bei der kombiniert behandelten Gruppe (Nachfolgend als "Kombination" abgekürzt) veränderte Raten der Skelettveränderungen vorliegen gegenüber den nur mit einem Medikament behandelten Gruppen. Die Unterteilung des Vergleichs erfolgt gemäß den

in der Einleitung definierten Kategorien der Addition, Potenzierung, des Nichts-Effekts und des Antagonismus. Dabei wird - soweit erforderlich - die unterschiedliche "Spontanmißbildungsrate" der beiden Stämme mit berücksichtigt. Verglichen werden nur die "relevanten Skelettregionen". Die Prozentzahlen werden in der Reihenfolge Kombinations-, Actinomycin D- und Cyclophosphamid-Gruppe angegeben.

Resorptionen: geringgradiger Antagonismus (0%, 0%, 4,2%).
Os parietale dextrolateral: geringgradiger Antagonismus (0%, 2,9%, 2,2%). Os parietale sinistrolateral: geringgradige Potenzierung (3,3%, 0%, 0%). Os parietale bilateral: Antagonismus (0%, 14,7%, 0%). Os interparietale: Kaum Veränderung (0%, 0%, 2,2%). Os supraoccipitale: geringgradiger Antagonismus (0%, 0%, 4,3%).
Vertebra (hantelförmig): Potenzierung (20,0%, 0%, 2,2%). Vertebra (gespalten): Nichts-Effekt (alle 0%). Vordere Extremitäten: Nichts-Effekt (alle 0%).

7b) 100 µg/kg Actinomycin D + 6 mg/kg Cyclophosphamid

Vergleich der am Tag 12+0 kombiniert mit 100 µg/kg Actinomycin D plus 6 mg/kg Cyclophosphamid behandelten Gruppe des Stammes SW 64 mit der Gruppe des gleichen Stammes, die am Tag 12+0 mit 100 µg/kg Actinomycin D behandelt wurde, und mit der Gruppe des Stammes SW 69, der am Tag 12+0 6 mg/kg Cyclophosphamid appliziert wurde. Für diesen Vergleich gelten die gleichen Gesichtspunkte, wie sie im vorangehenden Abschnitt beschrieben wurden. Die Angabe der Prozentzahlen erfolgt in der Reihenfolge: Kombinations-, Actinomycin D- und Cyclophosphamid-Gruppe.

Resorptionen: geringgradiger Antagonismus (0%, 0%, 3,4%). Os parietale dextrolateral: geringgradiger Antagonismus (0%, 2,9%, 0%). Os parietale sinistrolateral: Nichts-Effekt (alle 0%). Os parietale bilateral: Antagonismus (0%, 14,7%, 9,5%). Os interparietale: Antagonismus 2,9%, 0%, 16,2%). Os supraoccipitale: Antagonismus (2,9%, 0%, 31,3%). Vertebra: gewisse Potenzierung (hantelförmig: 31,4%, 0%, 14,9%; gespalten: 8,6%, 0%, 5,4%). Vordere Extremitäten: nicht sicher zu beurteilen (5,7%, 0%, 0%).

Zusammenfassung: Bei dieser Gruppe bewirkte die Pharmaka-Kombination an den Schädelknochen einen Antagonismus der Wirkungen (Ausnahme: Nichts-Effekt beim Os parietale sinistrolateral), an der Vertebra und den vorderen Extremitäten eine gewisse Potenzierung. Vergleicht man die beiden Kombinationen, so fällt eine deutliche Zunahme der Skelettveränderungen mit steigender Cyclophosphamid-Dosierung auf (Ausnahme: Os parietale sinistrolateral), sofern in beiden Gruppen überhaupt Veränderungen vorhanden sind. Weiterhin ist eine Heterogenität der Wirkungen sowohl bei kombiniert als auch bei nur mit einem Pharmakon behandelten Gruppen festzustellen, d.h. bei behandelten Tieren ist die Rate der Skelettveränderungen teils geringer, teils höher als bei der entsprechenden Kontroll-Gruppe.

8. Signifikante Unterschiede einiger Skelettveränderungen bei einzeln und kombiniert behandelten Gruppen (Tabelle 3)

Die Signifikanz-Berechnung nach dem χ^2 -Test ergab für den Vergleich der am Tag 12+0 mit 6 mg/kg Cyclophosphamid behandelten Gruppe mit der kombiniert behandelten Gruppe (6 mg/kg Cyclophosphamid + 100 μ g/kg Actinomycin D am Tag 12+0) folgende Resultate:

Os interparietale: Keine eindeutige Signifikanz.

Os supraoccipitale: Signifikante Veränderung (Antagonismus).

Vertebra: Keine eindeutige Signifikanz bei den hantelförmigen Veränderungen; keine Signifikanz bei den gespaltenen Wirbelkörpern.

Sternum-Kerne: Signifikante Veränderung (Antagonismus).

Für den Vergleich der am Tag 12+0 mit 4 mg/kg Cyclophosphamid behandelten Gruppe mit der kombiniert behandelten Gruppe (4 mg/kg Cyclophosphamid + 100 μ g/kg Actinomycin D am Tag 12+0) ergab der χ^2 -Test folgende Resultate:

Sternum-Kerne: Signifikante Veränderung.

Hyoid: Keine eindeutige Signifikanz.

Die drei Fälle von Signifikanz bezüglich der beiden Skelettregionen Os supraoccipitale und Sternum bedeuten in jedem Fall eine signifikante Erniedrigung der Raten bei den kombiniert mit Cyclophosphamid und Actinomycin D behandelten Gruppen gegenüber den nur mit Cyclophosphamid behandelten Gruppen.

Veränderungen	Zahl der Feten in den Einzel-Gruppen verändert unver- ändert	Zahl der Feten in der Kombination verändert unver- ändert	χ^2	Signifikant
Cs interparietale	12	62	34	nicht eindeutig
Cs supraoccipitale	23	51	34	ja
hantelförmig Vertebra	11	63	24	nicht eindeutig
Gespalten	4	70	32	nicht
Sternum-Kerne a)	68	6	25	ja
Sternum-Kerne b)	33	13	23	ja
Hyoid		32	29	nicht eindeutig

Tabelle 3: Signifikanzberechnungen einiger Skelettveränderungen nach dem χ^2 - Test

Dosierungen bei den Veränderungen Os interparietale bis Sternum-Kerne a): 6 mg/kg Cyclophosphamid (Einzelgruppe); 6 mg/kg Cyclophosphamid + 100 μ g/kg Actinomycin D (Kombination).

Dosierungen bei den Veränderungen Sternum-Kerne b) und Hyoid: 4 mg/kg Cyclophosphamid (Einzelgruppe); 4 mg/kg Cyclophosphamid + 100 μ g/kg Actinomycin D (Kombination)

E. Diskussion

=====

Zusammenfassend lassen sich die Befunde folgendermaßen beschreiben: Interessant ist der Befund, daß mit alleiniger Gabe von Actinomycin D am Tag 12 der Schwangerschaft eine Veränderung an den Wirbelkörpern nachgewiesen werden kann (33% hantelförmige Veränderungen bei einmalig 150 $\mu\text{g/kg}$), die eindeutig als "teratogen" angesehen werden muß und nicht als "Retardierung" interpretiert werden kann. Unseres Wissens ist ein solcher Befund eines analogen Effektes mit Actinomycin D zu einem so späten Zeitpunkt der Gestation noch nicht erhoben worden. Viele Befunde sprechen dagegen, daß Actinomycin D zu diesem Zeitpunkt noch in nenneswerter Menge auf den Rattenembryo übergeht - u.a. auch unpublizierte Befunde von KÖHLER mit radioaktiv markierter Substanz. Es wäre um so bemerkenswerter, wenn die Mißbildung durch eine Störung der Plazentarfunktion erklärt werden müßte, da z.Z. wenig Anhaltspunkte dafür vorhanden sind, daß eine Veränderung der Plazenta zu Mißbildungen von Feten führen kann. Bei beiden am Tag 12+C kombiniert mit 100 $\mu\text{g/kg}$ Actinomycin D und 4 bzw. 6 mg/kg Cyclophosphamid behandelten Gruppen ist die Rate der Skelettveränderungen im allgemeinen niedriger oder allenfalls gleich hoch, nur an der Vertebra und den vorderen Extremitäten höher als bei den am Tag 12+C nur mit 100 $\mu\text{g/kg}$ Actinomycin D oder nur mit 4 bzw. 6 mg/kg Cyclophosphamid behandelten Gruppen. Teilweise sind die Raten der kombiniert behandelten Gruppen auch niedriger als bei der entsprechenden Kontroll-Gruppe.

Als allerdings einziges Indiz dafür, daß Actinomycin D auch am Tag 12 appliziert noch echte Mißbildungen erzeugen kann, fanden wir 33,4% hantelförmige Wirbelkörper bei einer Dosierung von 150 $\mu\text{g/kg}$.

In Bezug auf einige Körperregionen war bei der Deutung der Skelettveränderungen Vorsicht angebracht. So ist das Fehlen oder die unvollständige Anlage von Hyoid und Sternum-Kernen am 21sten Tag

der Gravidität ein relativ häufiges Ereignis auch bei un-
behandelten Tieren.

An den Knochen der hinteren Extremitäten und des Beckengürtels
wurden in keinem Fall Veränderungen gefunden. Die Abnormitäten
waren auf andere Regionen beschränkt: Schädel- und Handwurzel-
knochen der vorderen Extremitäten, Vertebra und Rippen. Diese
Regionen zeichnen sich demnach durch eine besondere Empfindlich-
keit gegen Störungen der Entwicklung am Tag 12 aus.

Die unterschiedlichen Raten der Skelettveränderungen bei zwei
verschiedenen Rattenstämmen - besonders gut erkennbar an den
Kontroll-Gruppen - weisen auf die große Bedeutung der genetischen
Einheitlichkeit der Versuchstiere hin, wenn man verwertbare und
vor allem vergleichbare Ergebnisse erzielen will. Das bedeutet:
Wird ein Pharmakon Versuchstieren appliziert, die sich genetisch
voneinander unterscheiden, so muß man - besonders in der Teratologie -
mit unterschiedlichen Ergebnissen und großer Streuung rechnen.

Die Verhältnisse beim pharmakologischen Test an Embryonen sind kom-
plizierter als z.B. bei einem Test, an dem nur ein Organismus be-
teiligt ist. Denn bei den beschriebenen Experimenten wurden die Test-
substanzen zunächst vom mütterlichen Organismus aufgenommen, teil-
weise erst - so das Cyclophosphamid - in der Leber "gegiftet",
bevor sie den Embryonen diaplazentar zugeführt wurden. Es liegen
also für die Testsubstanz zwei "Kompartments" vor - Muttertier und Keim
die darüberhinaus durch eine Permeabilitätsbarriere, die Placenta,
getrennt sind. Daraus kann eine unterschiedliche Konzentration der
Testsubstanz sowohl in den beiden Organismen als auch bezüglich
der Anreicherung der Testsubstanz in den einzelnen Organen, mit der
Folge einer unterschiedlichen toxischen oder teratogenen Potenz
in den Organismen bzw. ihren Organen folgen.

Im Hinblick auf die kombiniert mit zwei Substanzen behandelten
Gruppen müßte biochemisch geklärt werden, wodurch im einzelnen die

die im Vergleich zur nur mit einem Pharmakon behandelten Gruppe, aber auch zur Kontroll-Gruppe, oftmals verringerte Rate der Skelettveränderungen bedingt ist. Das gleiche gilt für die Heterogenität der Wirkungen, d.h. daß die "Raten" durch die verwendeten Pharmakakombinationen teils erhöht, teils erniedrigt wurden im Vergleich zur jeweiligen Kontroll-Gruppe. Ansätze zur Aufklärung dieser Fragestellung finden sich bei KÖHLER (1970).

Die Ergebnisse der Arbeit wurden teilweise an geringen Tierzahlen erhoben. Weitergehende Schlüsse sind darum kaum möglich. Relativ geringfügige Effekte an den Embryonen einer Tierspezies nach Applikation eines Pharmakon schließen außerdem nicht aus, daß die gleiche Substanz an einer anderen Tierspezies bzw. am Menschen wesentlich stärkere Effekte bzw. Defekte machen kann. Darum ist Vorsicht angebracht bei der Interpretation von Statistiken über die Effekte von Medikamenten oder nicht vorhandene Effekte. Im Hinblick auf die möglichen Folgen bei der Anwendung am Menschen sollte der Empirie größere Bedeutung zukommen als der Statistik, d.h. daß Einzelbefunde genauso aufmerksam registriert werden sollten wie statistisch signifikante Befunde.

Es wird deutlich, daß neue Pharmaka an möglichst vielen Tierstämmen und -arten getestet werden sollten, um die möglichen Wirkungen so weit wie möglich zu erfassen, besonders aber die toxischen und teratogenen, wegen der möglichen irreversiblen Schädigungen bei der Anwendung am Menschen.

F. Zusammenfassung

=====

1. In der vorliegenden Arbeit wurde die embryotoxische und teratogene Wirkung einer Kombination von Cyclophosphamid und Actinomycin D an Ratten der Stämme WISTAR SW 64 und SW 69 untersucht.

2. Am Tag 11 bzw. 12 der Gestation wurde den Muttertieren 4, 5 bzw. 6 mg/kg Cyclophosphamid i.p. appliziert. Am Tag 12 wurde in weiteren

Versuchsreihen den Muttertieren 100 bzw. 150 $\mu\text{g/kg}$ Actinomycin D s.c. appliziert. In anderen Versuchsreihen wurde am Tag 12 der Gestation 100 $\mu\text{g/kg}$ Actinomycin D mit 4 bzw. 6 mg/kg Cyclophosphamid kombiniert verabreicht. Die Feten wurden am Tag 21 der Gestation durch Sectio gewonnen und anschließend gewogen, sowie makroskopisch beurteilt. Die Skelettentwicklung wurde nach "Aufhellung" und Anfärben des Skeletts mit Alizarin beurteilt.

3. Bei fünf von neun Versuchsgruppen war das Durchschnittsgewicht signifikant geringer als bei Kontrollgruppen.

4. Bei den am Tag 12 mit Cyclophosphamid behandelten Tieren fanden wir eine geringgradige Erhöhung der Resorptionsraten auf 3,6 - 4,2%; bei den am Tag 11 mit 6 mg/kg Cyclophosphamid behandelten Tieren jedoch eine erheblich höhere Resorptionsrate von 18,4%.

5. An morphologischen Auffälligkeiten wurden fehlende oder halbseitig angelegte Sternumkerne, fehlendes Hyoid, hantelförmige oder gespaltene Vertebrae, rudimentäre 13. oder 14. Costae, weniger als drei Metacarpalae der vorderen Extremitäten und Veränderungen der Verknöcherung des Os parietale, interparietale und supraoccipitale gefunden.

6. Auffallend war der teilweise große Unterschied zwischen den beiden Kontrollgruppen der Stämme SW 64 und SW 69 bezüglich einiger morphologischer Veränderungen wie z.B. am Os supraoccipitale, bei hantelförmigen Vertebrae, Sternumkernen sowie Fehlen des Hyoids. Diese Veränderungen werden durch Cyclophosphamid verstärkt (das Hyoid ausgenommen), während Actinomycin D nur die hantelförmigen Veränderungen an den Vertebrae verstärkt, ansonsten aber die Veränderungen eher geringfügig abgeschwächt bzw. kein eindeutiger Unterschied zur Kontrollgruppe des gleichen Stammes (SW 64, besteht (Sternumkerne ausgenommen).

7. Ferner kann bestätigt werden - wie bereits aus der Literatur bekannt -, daß sowohl die zeitliche Verschiebung der Applikation als auch die Höhe der Dosierung der Testsubstanzen Art und Zahl der Schädigungen beein-

flussen. Während z.B. 4 und 6 mg/kg Cyclophosphamid, am Tag 11 der Gestation appliziert, die Raten der hantelförmigen und gespaltenen Veränderungen an den Vertebrae deutlich und dosisabhängig steigern, sind die Raten nach gleichen Dosierungen am Tag 12 der Gestation deutlich verringert, wenn auch immer noch dosisabhängig. 100 μ g/kg Actinomy in D, am Tag 12 appliziert, haben keinen nachweisbaren Effekt auf die Skelettentwicklung. 150 μ g/kg Actinomycin D, am Tag 12 appliziert, beeinflussen lediglich die Rate der hantelförmigen Vertebrae (deutlich ansteigend).

8. Die Wirkung einer Kombination von Cyclophosphamid und Actinomycin D auf die Skelettentwicklung ist komplex. Es liegt bezüglich der Skelettregionen Os supraoccipitale und Sternumkerne eine eindeutig antagonistische Wirkung der beiden Testsubstanzen vor, während die antagonistische Wirkung bei den Regionen Os interparietale und Hyoid nicht eindeutig signifikant ist. Eine nicht eindeutig signifikante Potenzierung kann bei den hantelförmigen Vertebrae abgelesen werden.

Der χ^2 - Test wurde nach folgender Formel durchgeführt:

- a = Gruppe 1.) - beeinflusste Feten
- b = Gruppe 1.) - nicht beeinflusste Feten
- c = Gruppe 2.) - beeinflusste Feten
- d = Gruppe 2.) - nicht beeinflusste Feten

N = Gesamtzahl der Feten in beiden Gruppen

$$\chi^2 = \frac{((ad - bc) - 1/2N)^2 \cdot N}{(a + b) \cdot (c + d) \cdot (a + c) \cdot (b + d)}$$

Freiheitsgrad = 1

Literatur - Verzeichnis

=====

- BECKER, B.A.: Effects of Metabolic Inducers and Inhibitors on Drug-Induced Teratology in Mice
Fourth International Congress on Pharmacology 1969 Basel, p.496
- BROCK, N., Metabolism of cyclophosphamide
- HOHORST, H.-J.: Cancer 20, 900 (1967)
- ELIS, J., The Alteration of Actinomycin D Teratogenicity by Hormones and Nucleic Acids
DIPAULO, J.A.: Fourth International Congress on Pharmacology 1969 Basel, p. 497 (Abstract)
- ENGELS, K., KROWKE, R. Vergleichende Untersuchungen über die Alkylierung von embryonalem und mütterlichem Gewebe durch Cyclophosphamid
NEUBERT, D.: Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmak. exp. Path., 260, 110 (1968).
- GIBSON, J.E., BECKER, B.A. Modification of cyclophosphamide teratogenicity by phenobarbital and SKF-525-A in mice.
Teratology I, 214 (1968)
- GIBSON, J.E., Effect of phenobarbital and SKF 525-A on maternal distribution and placental transfer of radioactivity after administration of ¹⁴C - cyclophosphamide to mice
BECKER, B.A. Teratology 2, 260 (1969)
- GOLDBERG, I.H., Actinomycin Inhibition of RNA
REICH, E.: synthesis directed by DNA
Federation Proceedings 23, 958 (1964)

- KÖHLER, E.: Untersuchungen über den Stoffwechsel während der Differenzierungsphase der Ratte und über die Beeinflußbarkeit durch Pharmaka
Habilitationsschrift FU-Berlin, 1970
- VON KREYBIG, TH.: Kritische Phasen der Embryonalentwicklung bei der Ratte in ihrer Bedeutung für die Prüfung teratogener Wirkungen.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 247, 364 (1964)
- VON KREYBIG, TH.: Die teratogene Wirkung von Cyclophosphamid während der embryonalen Entwicklungsphase bei der Ratte
Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. und Pharmak. 252, 173 (1965)
- VON KREYBIG, TH.: Experimentelle Praenatal-Toxikologie
Aulendorf (1968)
- LISS, E., REINECKE, A.,
PALME, G.: Die Hemmung der Desoxyribonucleinsäure (DNS) - Synthese und die Beeinflussung der Zellvermehrung von Yoshida-Ascitestumorzellen durch alkylierende Substanzen
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 19, 1137 (1969)
- NEUBERT, D.: WIRKUNGSWEISE von Antimetaboliten. Paracelsusbeihefte, Vorträge des 20. Ärzetreffens in Kärnten, Velden, 23. bis 26. Mai 1968
- NEUBERT, I.: Zur Wirkungsweise von Cytostatika
Referat aus: Verhandlungsbericht der Deutschen Gesellschaft für Urologie, 22. Tagung vom 23. bis 26. Okt. 1968 in Berlin
- PALME, G., LISS, E.,
OEFF, K., PLATIS, A.: Der Einfluß von Cyclophosphamid auf die Desoxyribonucleinsäure-Synthese von normalen proliferierenden Zellen, sowie Ascites-Tumorzellen.
Arzneim.-Forsch. (drug res.) 13, 1034 (1963)

REICH, E., FRANKLIN, R.M.,
SHATKIN, A.J., TATUM, E.L.:

Effect of Actinomycin D on Cellular
Nucleic Acid Synthesis and Virus
Production

Science 134, 556 (1961)

REICH, E.:

Actinomycin: Correlation of Structure
and Function of its Complexes with
Purines and DNA

Science 143, 684 (1964)

TUEHMANN-DUPLISSIS, H.,
MERCIER-PAROT, I.:

Teratogenic action of the antibiotic
actinomycin D.

Ciba Foundation Symposium on congenital
Malformations, Boston, Little Brown
Co. (1966)

TUEHMANN-DUPLISSIS, H.:

Problèmes posés par le retentissement
des médicaments sur la progéniture

Pure- and Applied Chemistry 19, 1
(1969)

WILSON, J.G.:

Teratogenic Interaction of Chemical
Agents in the Rat

Pharm.exp. Ther. 144, 429 (1964)

WILSON, J.G.:

Effects of acute and chronic treat-
ment with actinomycin D on pregnancy
and the fetus in the rat.

Harper Hospital Bull. 24, 109 (1966)

.....

Vertrag zu 60.000 in 1000 'Markt'.

Vertrag über die Verpachtung, des. 1000, und 1000
'Markt'.

Vertrag über die Verpachtung in 1000 'Markt', von 1000
zu 1000.

Vertrag über die Verpachtung in 1000 'Markt', von 1000
zu 1000.

Vertrag über die Verpachtung von 1000 'Markt' zu 1000 'Markt'.
Vertrag über die Verpachtung von 1000 'Markt' zu 1000 'Markt'.
Vertrag über die Verpachtung von 1000 'Markt' zu 1000 'Markt'.

Vertrag über die Verpachtung von 1000 'Markt' zu 1000 'Markt'.
Vertrag über die Verpachtung von 1000 'Markt' zu 1000 'Markt'.
Vertrag über die Verpachtung von 1000 'Markt' zu 1000 'Markt'.
Vertrag über die Verpachtung von 1000 'Markt' zu 1000 'Markt'.

Vertrag über die Verpachtung von 1000 'Markt' zu 1000 'Markt'.
Vertrag über die Verpachtung von 1000 'Markt' zu 1000 'Markt'.
Vertrag über die Verpachtung von 1000 'Markt' zu 1000 'Markt'.
Vertrag über die Verpachtung von 1000 'Markt' zu 1000 'Markt'.



Bild 1

Kopf eines Ratten-
fetus der Kontroll-
gruppe.

Tag 21+0 der Gestation.
Stamm Wistar SW 64.



Bild 2

Vertebra eines Ratten-
fetus der Kontrollgruppe.

Tag 21+0 der Gestation.
Stamm Wistar SW 64.



Bild 3

Rattenfetus am Tag 21+0
der Gestation.

5 mg/kg Cyclophosphamid
i.p., appliziert am Tag
12+0 der Gestation.

Wirbelkörper hantelförmig
und gespalten.

Stamm Wistar SW 64.

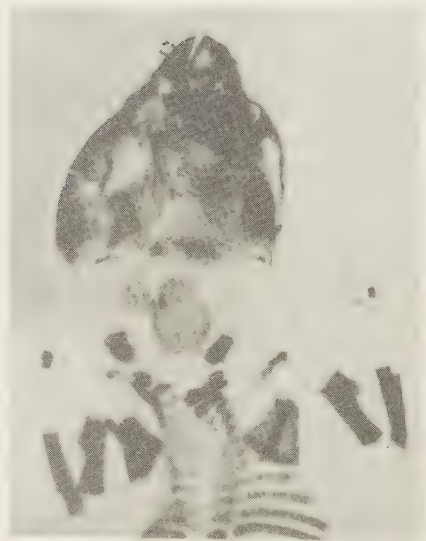
Bild 4

Rattenfetus am Tag 21+0
der Gestation.

6 mg/kg Cyclophosphamid
i.p., appliziert am Tag
12+0 der Gestation.

Das Os interparietale
ist verkleinert, das Os
supraoccipitale fehlt.

Stamm Wistar SW 69.



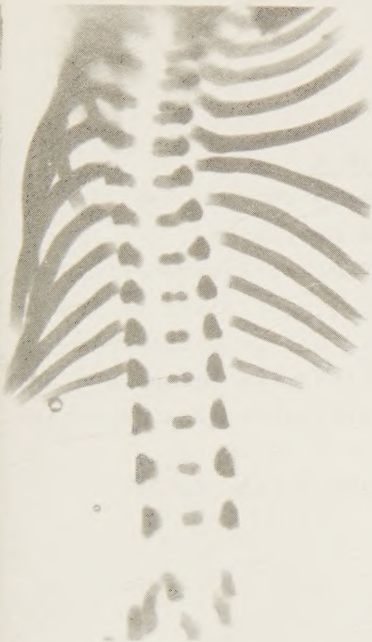


Bild 7

Rattenfetus am Tag 21+0 der Gestation.

100 μ g/kg Actinomycin D s.c., plus 4 mg/kg Cyclophosphamid i.p., beides appliziert am Tag 12+0 der Gestation.

Einige Wirbelkörper sind hantelförmig.

Stamm Wistar SW 64.

Bild 8

Rattenfetus am Tag 21+0 der Gestation.

100 μ g/kg Actinomycin D s.c. plus 6 mg/kg Cyclophosphamid i.p., beides appliziert am Tag 12+0 der Gestation.

Einige Wirbelkörper sind hantelförmig, einige gespalten.

Stamm Wistar SW 64.





Bild 5

Rattenfetus am Tag 21+0
der Gestation.

100 μ g/kg Actinomycin D
s.c., appliziert am Tag
12+0 der Gestation.

Keilförmige Aussparung der
Ossifikation des Os parie-
tale.

Stamm Wistar SW 64.

Bild 6

Rattenfetus am Tag 21+0
der Gestation.

150 μ g/kg Actinomycin D
s.c., appliziert am Tag
12+0 der Gestation.

Einige Wirbelkörper sind
hantelförmig.

Stamm Wistar SW 64.

